

B 96745

Közlemény

a M. Kir. Ferencz József Tudomány Egyetem Orvosi Vegytani Intézetéből

---

# **Új módszerek az intermediär anyagcseretermékek szerepének vizsgálatára.**

Doktori értekezés.

IRTA

és a m kir. Ferencz József Tudomány Egyetem Matematika  
és Természettudományi Karához benyújtja

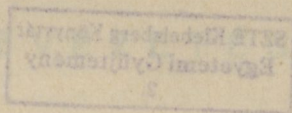
**Straub F. Brunó**

Szeged, 1936.

B 96745

Közlemény

a M. Kir. Ferencz József Tudomány Egyetem Orvosi Vegytani Intézetéből



# **Új módszerek az intermediär anyagcseretermékek szerepének vizsgálatára.**

Doktori értekezés.

IRTA

és a m kir. Ferencz József Tudomány Egyetem Matematika  
és Természettudományi Karához benyújtja

Straub F. Brunó

Szeged, 1936.



SZTE Klebelsberg Könyvtár  
Egyetemi Gyűjtemény  
2.

HELYBEN  
OLVASHATÓ



B 96745

SZTE Egyetemi Könyvtár



J000760013

## B E V E Z E T É S.

A biochemia régibb descriptiv irányzatával szemben ma az életfolyamatok dynamikájának vizsgálata áll előtérben. Míg a leíró biochemia makromódszereivel könnyen juthatott quantitativ adatokhoz, a funkcionális vizsgálatok kezdetben kénytelenek voltak megelégedni qualitativ adatokkal. Csak egészen nagy vonalakban mozgó általános anyagesere-problémák eldöntésére rendelkezett a biochemia oly módszerekkel, amelyek segítségével a változások időben egymásután tanulmányozhatók voltak. Nagyobb részében a kutatás sok ága még mindig qualitativ vizsgálatokkal elégszik meg s ez a helyzet az oxydatis problémák tárgyalásánál is. Például *Thunberg* klasszikus vizsgálatai (1), amelyek a dehydrationis elmélet alapvető észleleteihez tartoznak, csak qualitativ megállapítások. S ebben a qualitativ megvilágításban a dolog lényege könnyen elveszik: a qualitativ vizsgálat nem tudja megkülönböztetni a lehetségest a ténylegesen végbemenőtől. Így *Thunberg* kísérletei nem zárták ki annak a lehetőségét, hogy a borostyánkősav oxydatiojára vonatkozó sémája a szervezetben lejátszódik. De az azóta véghezvitt quantitativ vizsgálatok az ennek a sémának tulajdonított jelentőséget nagyban lecsökkentették. Még ezek az új quantitativ vizsgálatok is egy nagy hibában vannak: a túlélő szövetnek nagymennyiségű közti anyagesere termékkel való elhalmozása után izolálni igyekeznek a keletkezett terméket, vagy azt a terméket, amely az elgondolás értelmében keletkezik, ami rendszerint csak igen kis százalékban sikerül, tehát ismét csak kombinációkra nyújt alkalmat.

Végül még egy szempontot kell figyelembe vennünk a kísérletek értékelésénél. Hosszasan elhúzódó kísérletek végeredményében, amikor a túlélő szövetet pufferrel, idegen anyagok hozzáadásával, meginduló autolysissel stb megsértettük már, nem várhatjuk azt, hogy a szövet mint egy organizmus reagáljon, hanem reagálni fog mint egy fermentkeverék. Eredményeket kaphatunk de az, amit találunk nem a szervezet, nem az organizált működés, hanem a jelentős rész elpusztulásával a nem jelentős, kevésbé érzékeny mellékfolyamatok érvényesülnek.

Mindezek a megfontolások arra a gondolatra vezetnek hogy a biochemiai methodikának a következő feltételeket kell teljesítenie :

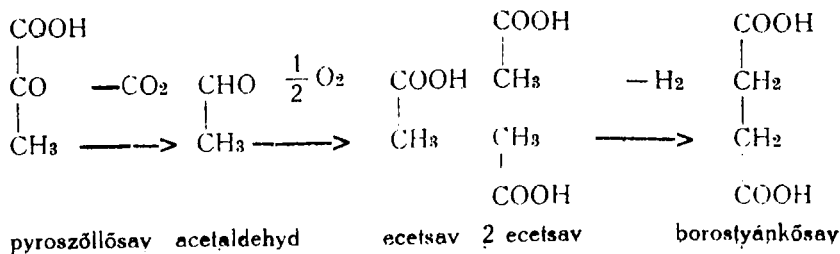
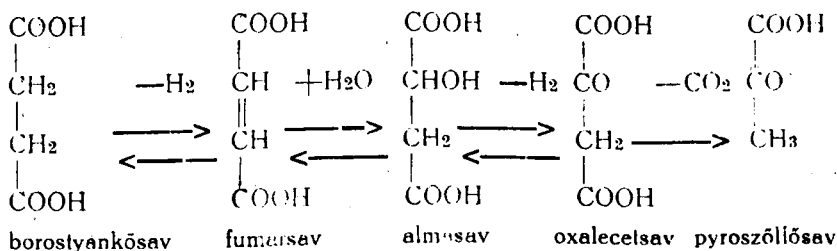
1) olyan mikromódszerekkel kell rendelkeznie, amelyek a viszonyoknak a physiologiás koncentrációt nem sokszorosán meghaladó méreteken való tanulmányozását teszik lehetővé.

2) A folyamatokat nem elegendő egy anyag szemmel tartásával követni, hanem az összes számbajöhető anyagokat egyformán quantitative kell ellenőriznünk mindaddig, amíg egyértelműleg meg nem feleltünk az átalakult anyagcsere termék teljes egészéért.

3) A mikromódszerek tegyék lehetővé a változásoknak olyan rövid időszakokban való vizsgálatát, amelyek mellett az eredeti viszonyoknak megfelelő működés várható.

Fenti szempontok figyelembevételével foglalkoztam azokkal a reakciókkal, amelyekben a fumarsav, almasav, oxalecetsav és pyroszőlősav a túlélő izomszövetben részt vehet. Az említett anyagok ilyen tárgyalása azért különösen érdekes, mert *Szent-Györgyi* (2) szerint az említett anyagok nemcsak az anyagcsere közti termékei, hanem az oxydatios mechanizmusba is mint katalysatorok be vannak kapcsolva. Hogy a közti anyagcsere és az oxydatios mechanizmus által kijelölt reactio utak közül melyiket követik ez anyagok, ennek a kérdésnek az eldöntésére van szükség olyan természetű kísérletekre és mikromódszerekre, amelyekről a fentiekben szólottam.

A borostyánkősav fenti leépítési termékeire *Thunberg* idézett vizsgálatai hívták fel a figyelmet, aki vizsgálatainak eredményeképpen ezeknek az anyagoknak, mint közti anyagcsere-termékeknek tulajdonított jelentőséget. *Thunberg* a következő körfolyamatot tételezi fel :



Tehát a borostyánkősav fele mennyisége eloxydálódik széndioxyddá és vízzé, míg a másik fele mennyisége visszaképződik a reakciólánc folyamán. Hogy ez a körfolyamat tényleg lejátszódik-e, arra vonatkozólag nincsen kielégítő quantitativ adatunk. Különösen az utolsó fázis, két molekula ecetsavnak intramolekuláris dehydrationja borostyánkőssavvá, az, amelyet quantitativ eredményekkel izomszövetre nézve bizonyítani eddig nem sikerült.

Gözszy és Szent-Györgyi galamb-izomszövettel végzett kísérleteikben abból a megfigyelésből, hogy a borostyánkősav oxydációját specifikusan gátló malonsav hatására az izomszövet saját légzése ugyanugy lecsökken, mint a borostyánkősav oxydációja, arra a következtetésre jutottak, hogy a borostyánkősav az izomszövet általános oxydatios mechanizmusának tagja. A további vizsgálatok során Szent-Györgyi és munkatársai (2) ki tudták mutatni, hogy nem maga a borostyánkősav, hanem ennek első oxydatios terméke, a fumarsav az, amely ezt a nagyfontosságú szerepet teljesíti. A fumarsavnak az általános oxydatios rendszerrel való összefüggését röviden a következőkben vázolhatjuk:

A szövetlégzés mai elmélete szerint az anyagcsere termékek nem közvetlenül oxydálódnak, hanem reverzibilis rendszerekből felépített láncreakció folyamán. A Warburg-féle „Atmungsferment” aktiválja az oxygent és ennek segítségével oxydálja a cytochromot. Másrészt a tápanyag hydrogenje specifikus fermentek, dehydrasek hatása alatt aktiválódik. Az eddigi felfogás szerint az oxydált cytochrom és az aktivált hydrogen reagálnak egymással, miközben víz, redukált cytochrom és dehydrátt (oxidált) tápanyag keletkezik. Szent-Györgyi elmélete szerint a cytochrom és az aktiv H közé illeszkedik be a fumarsav. Az oxydált cytochrom hat a fumarsavra (amely a fumardehydrase hatása alatt aktiválódik) és keletkezik redukált cytochrom és oxalecetsav. Az oxalecetsav reagál a tápanyagok aktivált H-jével, azokat oxydálva maga fumarsavvá redukálódik.

A két elmélet, mint látható, az oxalecetsav szerepét különbözőképpen ítéli meg. Míg Thunberg elmélete értelmében az oxalecetsav meg nem fordítható reakció révén decarboxylálódik pyroszörlőssavvá és további oxydatios fázisokon keresztül haladva csak fele mennyiségben alakul vissza ismét borostyánkőssavvá, addig az utóbbi elmélet feltételezi, hogy az oxalecetsavnak legnagyobb része redukálódik fumarsavvá. Nem volna ugyanis elképzelhető a fumarsav-oxalecetsavnak a légzésben vitt katalitikus szerepe akkor, ha jelentős mennyisége elveszne a Thunberg-féle elmélet követelte uton.

Szent-Györgyi elmélete értelmében tehát a) az oxalecetsavnak nagy sebeséggel kell redukálódnia fumarsavvá, b) nem szabad az oxalecetsav jelentős mennyiségének decarboxylálódnia, c) a fumarsav mennyiségének az izomszövetben állandónak kell maradnia. Utóbbi tulajdonképpen összefoglalása az első két követelménynek, tekintettel arra, hogy a vizsgálatok tanúsága szerint oxalecetsav az izomban nem mutatható ki, csak fumarsav, más szóval az oxalecetsav-fumarsav reverzibilis rendszer egyensúlya a szövetben erősen el van tolva a fumarsav javára.

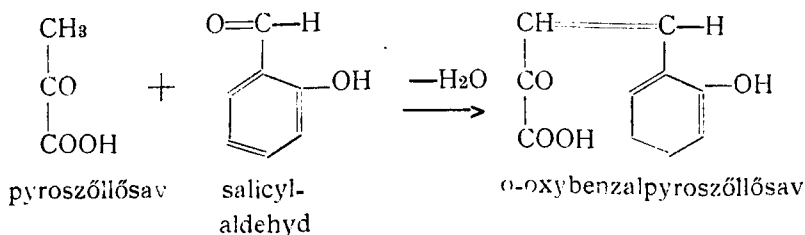
Ezeknek a kérdéseknek az eldöntésére független módszereket kellett kidolgoznunk a pyroszörlőssav, az oxalecetsav, a fumarsav és az almasav quantitativ meghatározására.

# I. Quantitativ pyroszöllősav meghatározás.

A pyroszöllősavnak az anyageserében elfoglalt centrális helyzete magyarázza azt, hogy quantitativ meghatározásával már több szerző foglalkozott. Ezek a meghatározások azonban nem elég specifikusak ahhoz, hogy a pyroszöllősav kisebb mennyiségének átalakulásait ill. képződését oxalecetsav mellett kimutathassák. *Wieland* (3), *Cobk* (4), *Case* (5) módszerei nem tudnak különbséget tenni a pyroszöllősav és az oxalecetsav között. A pyroszöllősavnak tejsavvá való redukálásán és a tejsavnak meghatározásán alapuló módszerek (összefoglalásukat l. *Wendel* (6)) kivitele közben is decarboxylálódna az oxalecetsav s a meghatározást bizonytalanná tenné.

A pyroszöllősavnak általam kidolgozott kolorimetriás meghatározása lényegében az organikus chemiában jól ismert *Perkin*-synthesis alkalmazása. Egészen sajátos módon azt tapasztaltam, hogy erős alkalikus közegben a pyroszöllősav methylesoportja salicylaldehyddel bevihető egy *Perkin*-synthesisbe, míg az oxalecetsavé nem. Ez a körülmény talán azzal magyarázható, hogy az oxalecetsav ebben a közegben igen erősen enolizálva van. Megjegyzendő, hogy a meghatározás elve már *Csonka* (7) acetonsmeghatározásában benne van, aki az acetont salicylaldehyddel lúgos közegben kondenzálja o-oxydibenzalacetonná és szintén kolorimetriásan határozza meg. Mivel pyroszöllősav esetében a kondenzáció könnyebben megy végbe, kevesebb salicylaldehyddel és kevesebb KOH-val dolgozhatunk mint *Csonka* módszerében, ami a salicylaldehyd saját színének gyöngülése miatt nagy előnyt jelent, különösen kisebb koncentrációk meghatározásánál.

A kondenzációs reakció, amelyen a módszer alapszik, a következő:



A keletkezett terméket nagyban is előállítottuk és sajátosságai alapján azonosnak bizonyult az o-oxybenzalpyroszöllősavval, amelyet R. N. *Sen* és B. K. *Sen* (8) állítottak elő.

### *A meghatározás kivitele.*

Reagensok: 1.) 2 ccm. salicylaldehyd (synth. Kahlbaum) oldva 100 ccm-re 96 %-os alkohollal. 2.) 100 g KOH és 60 g vízből előállított KOH-oldat.

A meghatározásra szánt oldat 1 ccm-éhez adunk 0,5 ccm salicylaldehydoldatot és 1,0 ccm lugoldatot, jól összekeverjük és 37 fokos vízfürdőben 10 percig állani hagyjuk. Ekkor kivesszük a próbát és szobahőmérsékletre lehűtve kolorimetrizáljuk. Az oldat, amelyből a meghatározást végezzük, ne tartalmazzon több pyroszöllósavat mint 0,6 mgr. ccm. Ha ennél koncentráltabb, akkor vízzel előzőleg kellő mértékben fel kell hígítanunk.

A kolorimetrizálást a Pulfrich-féle Stufenphotometerrel végeztem. Legmegfelelőbbnek találtam a 0,1 cm-es küvettát és az S 47 jelzésű színszűrőt. A színszűrő kiválasztásánál figyelembe vettem, hogy annak a színnek az absorptiója, amely a reagensektől (salicylaldehyd + KOH) származik, relative kicsi legyen a kondenzációs termék színéhez képest.

A eredmények quantitativ értékelése végett koncentráció sorozatokat készítettem pyroszöllósavból és mindig ugyanarra a küvetta vastagságra nézve meghatároztam az absorptio értékeket. A Stufenphotometeren leolvasható a vizsgálandó oldatot tartalmazó küvetta oldalán az  $I_0$  érték (ezt mindig 100-nak választottam), míg a másik oldalon destillált vízzel telt ugyanolyan vastag küvetta van elhelyezve s ezen az oldalon a dobon leolvasható az  $I$ , ha a két látómező egyformán világos. A két adatból Beer-Lambert törvénye szerint:

$$\log \frac{I_0}{I} = E. c. d.$$

Mint látható, a baloldalon képezett kifejezés, az extinctio egyenesen arányos a koncentrációval. (E a molaris extinctios koeficiens,  $c$  a molaris koncentráció és  $d$  a küvetta vastagsága cm-ben.) A jelen esetben az eredmények azt mutatták, hogy a Beer-Lambert törvény nem alkalmazható a koncentráció meghatározásánál, az extinctió értékek nem változnak lineárisan a koncentrációval. Ennek oka természetesen könnyen megadható abban, hogy a szín keletkezéséhez vezető kondenzációs reakció nagyobb koncentrációban nem játszódik le olyan mértékben mint kisebb koncentrációban. Ezen okból úgy jártam el, hogy több pyroszöllósav koncentráció sorozatból tapasztalati összefüggést állapítottam meg a koncentráció és az absorptió érték ( $I$ ) között.



A módszer hibáinak bemutatására szolgál a következő összeállítás, amely ismert pyroszöllőssavkoncentrációknak a tapasztalati görbe alapján értékelt meghatározását mutatja:

I. Táblázat.

1 ccm-ben mg pyroszöllőssav	talált mg pyroszöllőssav	hiba %
0.053	0.057	+8
0.053	0.053	0
0.10	0.095	-5
0.10	0.095	-5
0.13	0.13	0
0.13	0.13	0
0.16	0.17	+6
0.16	0.17	+6
0.26	0.24	-8
0.26	0.24	-8
0.32	0.33	+3
0.32	0.34	+5
0.64	0.62	-3
0.64	0.66	+3

Ezekből az adatokból látható, hogy pyroszöllőssav a fenti koncentráció határookban a módszer segítségével 5·10<sup>-6</sup>-os hibával meghatározható.

Ami a módszer specifikus voltát illeti, az acetone és az acetaldehyd zavarhatják a reakciót, az oxalecetsav mint említettük nem zavar. Előbbi két anyag azonban physiologiás körülmények között csak igen kis mennyiségben van jelen, másrészt ha jelen lennének 50—60 fokon rövid idő alatt eldisszolválnak.

A módszer használhatóságának fontos feltétele, hogy a meghatározások fehérjétlenített izomléből is elvégezhetők legyenek, ill. az izomszövethez tett vagy abban keletkezett pyroszöllőssav kimutatására alkalmas legyen. Ennek eldöntésére meghatározásokat végeztem az izomszövethez tett pyroszöllőssavból. E kísérleteket úgy végeztem, hogy a szokásos módon\* elkészített izomsuspensio 4 ccm-ét 0, 5 ccm 10<sup>-6</sup>-os Na<sub>2</sub>WO<sub>4</sub> és 0, 5 ccm

\* Az izomsuspensio elkészítése a következő: Lapie-daráló segítségével felaprózott frissen kivett galambmellizomból 1 g-ot suspendálunk 3 ccm 2.67/15 mol pH 7-es phosphatpufferben, s ennek a suspensionak 1.5 ccm-éhez adunk 2.5 ccm vizet vagy neutralizált oldatokat.

10%-os  $\text{H}_2\text{SO}_4$  segítségével fehérjétlenítve megszűrtem s a keletkezett tiszta oldatból határoztam meg a pyroszöllósavat. Trichloreetsav a fehérjétlenítéshez nem alkalmazható, mivel úgy látszik, a salicylaldehyddel sárga szín keletkezése közben reakcióba lép.

Ezek a kísérletek azzal az eredménnyel jártak, hogy ha a fehérjétlenített izomléhez adunk pyroszöllósavat az éppen olyan jól meghatározható, mint tiszta vizből, míg ha az izomhoz adjuk s akkor fehérjétlenítünk, a szűrletben a pyroszöllósav nem található vissza teljes egészében. Ez arra mutat, hogy a pyroszöllósav a izomfehérjéhez adsorbeálódik. A kérdés eldöntésére különböző mennyiségű pyroszöllósavat (Na-só alakjában) tettem a 4 ccm. izomszuszpenzióhoz és szobahőmérsékleten 1 percig rázogatva az izomszövevvel, az 1 perc letelte után fehérjétlenítettem, majd 1 ccm szüredékből meghatároztam a pyroszöllósav mennyiségét. Az eredmények a II. táblázatban vannak összefoglalva, az adatok mg-ban fejezik ki a 4 ccm. izomszuszpenzióban volt pyroszöllósav mennyiségét, s a meghatározás eredménye is át van számítva erre az eredeti térfogatra.

II. Táblázat.

1 ccm suspensiohoz tett pyroszöllósav	Talált mg pyroszöllósav		Középérték	Veszteség mg-ban	Veszteség %-ban
0.5	0.25	0.21	0.22	0.28	56
	0.21	0.21			
	0.21	0.25			
1.0	0.58	0.58	0.59	0.41	41
	0.58	0.58			
	0.58	0.63			
1.5	1.05	1.06	1.04	0.46	30
	1.00	1.00			
	1.05	1.06			
2.0	1.44	1.44	1.41	0.58	29
	1.50	1.50			
	1.33	1.33			
2.5	2.02	2.17	1.81	0.69	28
	1.87	1.87			
	1.50	1.44			
3.0	2.40	2.30	2.26	0.74	25
	2.20	2.15			

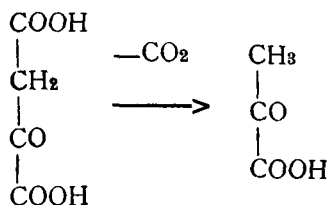


A táblázat adatai azt mutatják, hogy az elveszett pyroszőlősav abszolút mennyisége növekszik a hozzátett mennyiség növekedésével, míg a százalékos veszteség csökken. Hogy a pyroszőlősav veszteség, amelyről itt szó van, nem enzimatis pyroszőlősavátalakítás révén áll elő, azt a koncentrációs görbe isotherma-típusán kívül az a kísérlet bizonyítja, amikor nem 1 perc, hanem 15, 30 perc múlva végeztem meghatározásokat és közelítőleg ugyanazokat az értékeket kaptam, mint 1 perc után.

Látható, hogy a meghatározás hibája izomszövet jelenlétében már nagyobb. Ha a közölt középértékektől számítjuk a hibát, egy meghatározás közepes hibája 6.6 %.

## II. Az oxalecetsav decarboxylatioja.

Az előbbieken leírt pyroszőlősavmeghatározás segítségével tanulmányoztam az oxalecetsavnak spontán, vizes közegben végbemenő bomlását a következő reakció értelmében:

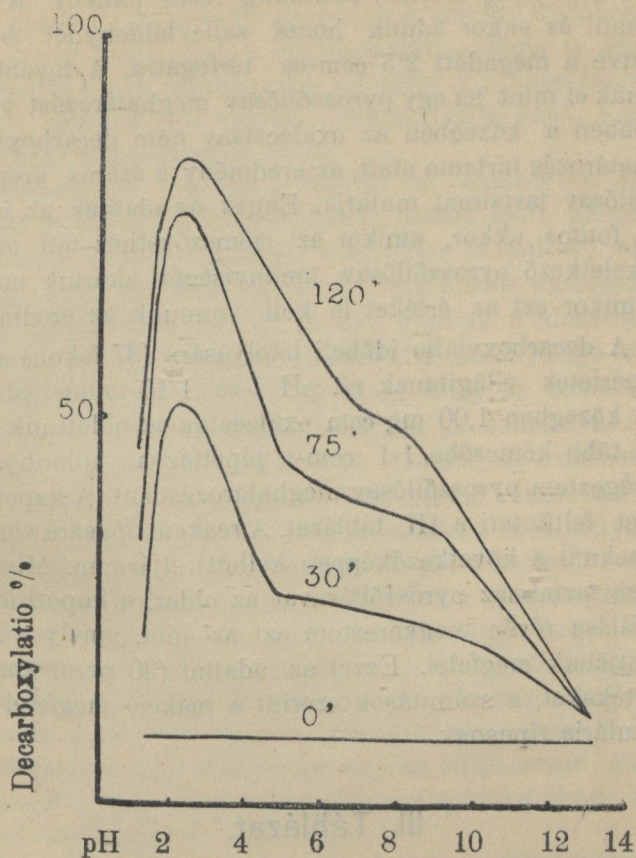


Hogy az oxalecetsav vizes közegben gyorsan decarboxylálódik a fenti egyenlet szerint, az régóta ismeretes. Quantitativ adatokkal azonban nem rendelkezünk a bomlás pontosabb ismeretére. Egyrészt az oxalecetsavmeghatározás, másrészt a pyroszőlősavmeghatározás és nem utolsósorban a kísérleti eredmények értékelése azonban megköveteli, hogy a spontán végbemenő reakciókkal quantitative tudjunk számolni. Ezért meghatároztam az oxalecetsav spontán decarboxylatioját különböző pH-k mellett és vizsgáltam a reakció időbeli lefolyását. Mindkét kísérletet 37 fokon, pyroszőlősav meghatározások segítségével végeztem. Az eredményeket a következőkben foglalhatom össze:

1. A decarboxylatio pH függvénye. Phosphorsav és NaOH oldatok segítségével állítottam elő pH sorozatot, amelyben a pH értékeket elektrometriásan kontrolláltam. Ezekkel készült 1 mgr oxalecetsav/cm koncentrációju oldatokat 30 percig, 75



percig és 120 percig hagytam állani 37 fokon és ez idők letelte után végeztem mindegyikből pyroszöllősav meghatározásokat. Az eredményt szemlélteti az 1. sz. ábra.



1. ábra. Az oxalecetsav spontán decarboxylatiojának pH függvénye.

Mint látható, a decarboxylatio maximális sebességgel folyik le pH 2 és 3 között, amely kb. megfelel az oxalecetsav első disszociációs konstansának. Sajátságos módon a decarboxylatio erősen savas, de még inkább erősen lúgos közegben visszaszorul. Ha olyan koncentráció lúgot alkalmazunk, mint amely a pyroszöllősav meghatározásnál szerepel, akkor 1 óra elteltével alig találunk több pyroszöllősavat mint a kísérlet kezdete kor. A kísérlet megkezdésekor mindig találunk pyroszöllősavat az oxalecetsavban. Ennek oka az, hogy a preparatum lassan decarboxylálódik és a feloldás alatt is keletkezik kevés pyro-

szőlősav. Az oxalecetsavpreparatum pyroszőlősav tartalmát ellenőrizhetjük az előbbi kísérlet tapasztalatai alapján oly módon, hogy nagyobb mennyiséget (10—20 mgr a várható pyroszőlősavmennyiség szerint) feloldunk 1 ccm tömény KOH-ban közvetlenül és ekkor adunk hozzá salicylaldehydet és vizet, kiegészítve a megadott 2·5 ccm-es térfogatra. A továbbiakban úgy járunk el mint ha egy pyroszőlősav meghatározást végzünk. Mivel ebben a közegben az oxalecetsav nem decarboxylálódik a meghatározás tartama alatt, az eredmény a száraz preparatum pyroszőlősav tartalmát mutatja. Ennek az adatnak az ismerete nagyon fontos akkor, amikor az izomszövethez tett oxalecetsavból keletkező pyroszőlősav mennyiségét akarjuk meghatározni, amikor ezt az értéket le kell vonnunk az eredményből.

2. A decarboxylatio időbeli lefolyására (37 fokon) a következő kísérletek világítanak rá. pH 7-es 1/15 molos phosphatpufferes közegben 1,00 mg/ccm oxalecetsavat oldottunk fel. Az oldatból több kémcsőbe 1-1 ccm-t pipettázva, különböző idők múlva végeztem pyroszőlősav meghatározásokat. A kapott eredményeket feltünteteti a III. táblázat. A reakció típusára vonatkozó számításoknál a következőképpen kellett eljárnom. Mivel már kezdetben tartalmaz pyroszőlősavat az oldat, a kapott időgörbe extrapolálása révén megkerestem azt az időt, amely a reakció 0-időpontjának megfelel. Ezzel az adattal (30 perc) korrigálva az időértékeket, a számítások szerint a reakció megfelel a monomolekuláris típusnak.

### III. Táblázat.

Idő perc	Keletkezett pyroszőlősav mgr	$k = \frac{1}{t} \ln \frac{a}{a-x}$
0	0·082	4·3 · 10 <sup>-3</sup> ·
10	0·120	4·9 . "
20	0·127	4·2 . "
30	0·150	4·2 . "
40	0·172	4·3 . "
50	0·197	4·4 . "
60	0·226	4·5 . "
120	0·343	4·8 . "



Hasonló körülmények között megismételve a kísérletet, azonos eredményre jutottam.

Az oxalecetsav spontán decarboxylatiojára vonatkozó vizsgálatok közül P. *Mayer* (9) eredményei szerint 38 fokon 24 óra alatt 50 %-ig megy csak a decarboxylatio, *Hahn és Haarmann* (10) hasonlóképpen alacsonyabb adatokat közölnek mint a fenti kísérletek. *Wieland* (11) adatai 27 fokra vonatkoznak, s így egyszerűen nem hasonlíthatók össze.

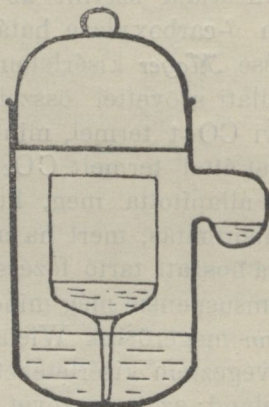
*Thunberg* (12) teoriája szerint az oxalecetsav az állati szervezetben egy u. n.  $\beta$ -carboxylase hatása alatt átalakul pyroszöllósavvá. Feltevése *Mayer* kísérletein alapult (9), aki megállapította, hogy az állati szövettel összehozott oxalecetsav 24 óra alatt kétszer annyi  $\text{CO}_2$ -t termel, mint az oxalecetsav egyedül, míg az izomszövet által termelt  $\text{CO}_2$  mennyisége elhanyagolható. *Wieland* (11) állapította meg, hogy az izomszövetnek ez a hatása nem fermenthatás, mert ha az izomszövet fehérjéit elpusztítjuk, negyedóra hosszatt tartó főzéssel, az oxalecetsav decarboxylatioját az izomsuspensio még mindig kétszeresére fokozza. *Hahn és Haarmann* megerősítik *Wieland* eredményeit (10). Erre vonatkozólag is végeztem kísérleteket s hasonló eredményre jutottam mint *Wieland*: az izomszövet a spontán decarboxylatiót kétszeresére fokozza, valószínűleg azért, hogy nonspecifikus adsorptio révén katalysálja a reakciót. Sajátságos módon azonban *Wieland* észrevétele mindeztideig nem tudta az irodalomban a  $\beta$ -decarboxylatio létezését megcáfolni, holott ennek a ténynek nagy jelentősége van az oxalecetsav átalakulásaira vonatkozólag, kizárván éppen azt a lehetőséget, amelyet *Thunberg* tételezett fel.

Itt megjegyzem még azt, hogy annak bizonyítása, hogy az oxalecetsav az izomszövetben nem decarboxylálódik a fenti kísérletekkel nem érhető el. Ennek a ténynek a bizonyítása ellenben megadható akkor, amikor az izomszövethez tett almasav viselkedését vizsgáljuk quantitativ meghatározásokkal. (L. VI. fejezet.)

### III. Oxalecetsav meghatározás.

Az oxalecetsav meghatározására ezideig kizárólag az *Ostern* (12) által közölt módszer ismeretes, amely azon az ismert tényen alapszik, hogy sz oxalecetsav decarboxylatioját anilin katalysálni képes. A módszer meglehetősen körülményes, Warburg készülékben manometrikusan méri a keletkezett  $\text{CO}_2$ -t, a vízfürdő hőmérsékletével nem szabad 5 fok fölé menni.

Ezt a reakciót az oxalecetsavon kívül adja az acetecetsav is.



2. ábra.

*Ostern* módszerét azáltal sikerült leegyszerűsítenem, hogy a meghatározást nem Warburg edényben, hanem a mellékelt 2. sz. ábrán látható berendezésben végzem el és nem acetat pufferben, hanem 50 %-os alkoholos közegben, nyers anilinnal, amely körülmények között a decarboxylatio pillanatnyilag lejátszódik. A felszabaduló  $\text{CO}_2$ -t a készülékben elhelyezett  $\text{Ba}(\text{OH})_2$  oldatban felfogva, a baryt visszatitrálása révén határozom meg. A meghatározás kivitele a következőképpen történik.

A 2. ábrán rajzolt főedénybe helyezük a meghatározandó vizes oxalecetsavoldatot, ugyanannyi térfogat alkohollal higitva. Az oldaledénybe kerül 0.2 ccm 10 %-os alkoholos oldata barna (polimerizált) anilinnak. A betét edénybe egy csepp phenolphtaleint, egy csepp octylalkoholt, 0.2 ccm aethylalkoholt és 1 ccm  $\text{Ba}(\text{OH})_2$  oldatot tesztek, amelynek a töménységét úgy választom meg, hogy a visszatitrálás alkalmával  $n/20$   $\text{HCl}$ -ből 1—3 ccm-t fogyasszon. (Az octylalkohol a titrálásnál alkalmazott keverésnél a habzás meggátolására, az aethylalkohol a keletkező  $\text{BaCO}_3$  leüleptetésére szolgál). Csapzssirral bekent becsiszolt üveg-

dugóval légmentesen elzárva az apparátust, az oldaledény tartalmát az edény megdöntésével összehozzuk az oxalecetsav oldattal. A  $\text{CO}_2$  teljes megkötése végett az egész edényt 20-30 percig rázatom rázógépen. A maradék  $\text{Ba}(\text{OH})_2$ -t sósavoldattal visszatitrljuk, e művelet közben a folyadékot  $\text{CO}_2$  mentes levegő átáramoltatásával keverve. A visszatitrlás alkalmával 1'0 ccm n 20 HCl oldat megfelel 1'10 mgr  $\text{CO}_2$ -nek tehát 3'30 mg oxalecetsavnak. Magától értetődő, hogy az összes műveleteket gyorsan kell elvégeznünk, hogy a barytvíz  $\text{CO}_2$  tartalmu levegővel ne nagyon érintkezzék. Minden kísérletsorozattal kapcsolatosan beállítottam egy kontrollt, amely anilint, vizes alkoholt és a betét edényben minden alkotórészt tartalmazott kivéve oxalecetsavat. Ily módon az edény terének, valamint a reagenseknek  $\text{CO}_2$  tartalmából eredő hibát kiküszöböltem.

Tiszta oxalecetsavoldatokból végzett meghatározások a következő táblázatban vannak összefoglalva:

IV. Táblázat.

Oxalecetsav mg	Talált mg oxalecetsav	Hiba %
0,47	0,50	+6
0,47	0,44	-6
0,71	0,67	-5
0,71	0,73	+2
0,95	0,92	-3
0,95	0,88	-8
0,95	0,95	0
0,95	0,93	-2
0,95	0,90	-5
0,95	0,96	+1
0,95	0,95	0

A meghatározás a fentiek alapján tiszta oxalecetsav oldatból 4'1%-os hibával végezhető el. A módszer azonban nem alkalmazható jól izomszövetből végzett meghatározásoknál, amikor a szövetben levő  $\text{CO}_2$  zavaró hatása érvényesül. De nagyon alkalmas annak megvizsgálására, hogy az oxalecetsavpreparátum hány százalék oxalecetsavat tartalmaz. Ezt a következőképpen végezhetjük el: 10 mgr körüli mennyiséget oldunk fel 50 százalékos vizes alkoholban s a fentiek szerint meghatározzuk a decarboxylálással leadott  $\text{CO}_2$  mennyiségét. Az említett nagyobb

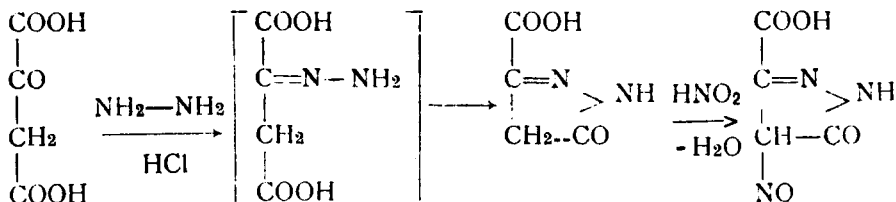
koncentrációban a módszer hibája már 1 százalék alatt van  
Erre példát mutat a következő analysis :

Bemért oxalecetsav	10·4 mg	8·5 mg	9·1 mg
Talált oxalecetsav	10·23 „	8·45 „	8·98 „
Oxalecetsavtartalom tehát	98.9 $\pm$ 0·5 %.		

#### IV. Kolorimetriás oxalecetsavmeghatározás.

Az oxalecetsav quantitativ meghatározására a következő módszert találtuk nagyon alkalmasnak.

Az oxalecetsavat savanyu közegben hydrazinnal hozzuk össze, amikor keletkezik az oxalecetsav hydrazonja, ez azonban rögtön átrendeződik egy ciklikus vegyületté : pyrazolon—3—carbonsavvá. Ha most salétromossavval hatunk erre a vegyületre, keletkezik a 4—nitroso—pyrazolon—3—carbonsav, amely alkalikus közegben szép sárgás vörös színt mutat.\*



A módszernek nagy előnye az, hogy oxalecetsavmentes közegben a reactio teljesen szintelen, ami kis mennyiségek kimutatását teszi lehetővé.

Egyedül az acetecetsav zavarhatná, de csak az oxalecetsav mennyiségének 100-szorosát meghaladó koncentrációban. Így a reakció biochemiai szempontból egészen specifikusnak mondható.

A tisztán előállított végterméknek megállapítottam a molaris extinctios koefficiensét és pedig olyan sók jelenlétében, amelyek az izomszövetből végzett meghatározásnál elkerülhetetlenek és állandóan egyforma koncentrációban vannak jelen. (m/15 phosphatpuffer ph 7, ennek 4 ccm-ére 0·5 ccm 10 %-os  $\text{Na}_2\text{WO}_4$  és 0·5 ccm 10%-os  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ; az így nyert oldat 1 ccm-éhez teszek 1·4 ccm hydrazinos reagenst és 0·1 ccm nitrit

\* A reactio mechanizmusát dr. Bruckner Győző egy. m. tanár ur megjelenés alatt levő közleményében igazolja.

oldatot (l. alább) s végül 1 ccm KOH oldatot. Ebben a keverékben oldom fel a 4—nitroso—pyrazolon—3 - carbonsavat) Különböző koncentrációkat megvizsgálva azt találtam, hogy az absorptio követi a Beer-Lambert törvényt és a Stufen Photometer S 43 színszűrőjével dolgozva a molaris extinctioefficientense 2166. Hasonló körülmények között az acetecetsavnak megfelelő 4—nitroso—3—methyl—pyrazolon molaris extinctios coefficientense 21.

Oxalecetsav oldatból végzett meghatározások arra a következtetésre vezettek, hogy a jelzett vegyület nem képződik 100  $^{\circ}$ /-ig, hanem csak egy bizonyos kitermeléssel, ami standard körülmények között állandó s így a methodus használhatóságát nem befolyásolja, de mégis azt eredményezi, hogy az extinctio és a koncentráció között az összefüggés nem lineáris. Ezért ismét egy tapasztalati görbét állítottam fel több oxalecetsavmeghatározás alapján, amelyről az I leolvasásnak megfelelő koncentráció leolvasható.

A módszer kivitele a következő:

*Reagensok*: 1. KOH oldat 100 g KOH és 60 g vízből. 2. Hydrazinos reagens: 2,7g hydrazindichlorhydratot oldunk 30 ccm vízben, ehhez adunk 100 ccm aethylalkoholt (96 $^{\circ}$ /-ost) és ezután kevergetés közben lassankint adunk az elegyhez 25 ccm conc. sósavat (fs. 1,19). 3. Nitrit oldat, hidegen telített NaNO<sub>2</sub>-oldat.

A vizsgálandó oldatból (amely phosphatot, stb. a fent megadott koncentrációban tartalmaz) 1 ccm-t veszünk a meghatározáshoz és 1,4 ccm hydrazinos reagenssel jól összekeverve 15 percig tartjuk 37 fokon. Ezután 0,1 ccm nitritreagenssel jól összekeverve 5 percig hagyjuk állni s 5 perc múlva 1,0 ccm KOH oldatot adva az elegyhez, szobahőmérsékletre engedjük lehűlni s lehetőleg rögtön kolorimetrizáljuk. A kolorimetriás meghatározást ismét Stufen-Photometerrel végeztem, S43 színszűrővel, 0,25 cm vastag küvettákkal, egyik oldalon dest. vízzel, másik oldalon a vizsgálandó oldattal. Az eredmények kiértékelését az említett (42 koncentrációdattal alapján felvett) tapasztalati görbe alapján végezhetjük el. Tiszta oxalecetsav oldatból végzett meghatározások eredményét tünteti fel az V. Táblázat:



V. Táblázat.

Oxalecetsav mg 1 ccm-ben	Talált mg oxalecet- sav	Hiba ‰	Oxalecetsav mg 1 ccm-ben	Talált mg oxalecet- sav	Hiba ‰
1,345	1,36	+1	0,76	0,73	-4
	1,29	-3		0,74	-2
	1,32	-2		0,76	0
1,26	1,18	-6	0,67	0,70	+4
	1,29	+3		0,66	-1
	1,27	+1		0,65	-3
1,17	1,25	+6	0,59	0,54	-7
	1,15	-2		0,58	-2
	1,26	+7		0,58	-2
1,09	1,06	-3	0,50	0,52	+4
	1,09	0		0,50	0
	1,12	+3		0,50	0
1,01	1,05	+4	0,42	0,39	-7
	1,01	0		0,38	-10
	0,99	-2		0,42	0
0,93	0,89	-4	0,34	0,38	+12
	0,94	+1		0,29	-15
	0,93	0		0,34	0
0,84	0,87	+4	0,25	0,26	+4
	0,82	-2		0,26	+4
	0,81	-3		0,25	0

Mint a táblázatban közölt adatokból látható, az oxalecetsav vizes közegből 4,5 ‰ közepes hibával határozható meg. Fehérjétlenített izomléből végzett meghatározások azt mutatták, hogy az oxalecetsav abból is jól meghatározható.

Izomszövethez tett oxalecetsav meghatározása esetén ugyanolyan veszteségekre találunk, mint a pyroszöllősav esetében is. A viszonyok itt annyiból komplikáltak, hogy az oxalecetsav a pyroszöllősavval ellentétben igen gyorsan eltűnik az izomszövetben enzimatis redukció révén. Így az adsorptios kísérletek csak megközelítéssel végezhetők el. 0 fokra hűtött oldatokkal és izomszuszpenzióval végeztem kísérleteket. A táblázatban feltüntetett adatok mutatják, hogy különböző időben végzett meghatározások között lényeges differencia nincs, tehát az adsorptio már befejeződött, s utána más reakció nem játszódik le a kísérleti feltételek között. A veszteség és a koncentráció között megrajzolható összefüggés alapul szolgálhat az oxalecetsav meghatározások eredményének korrigálására.

VI. Táblázat.

0.5 g izomra (5 ccm) vett oxalecetsav mg	Vizsgálat ideje perc	Talált mg oxalecetsav	Veszteség mg-ban középérték	Veszteség %-ban
1.5	1	0.90	0.60	40
	3	0.90		
	7	0.90		
	13	0.90		
3.0	1	1.99	1.02	34
	3	2.16		
	7	1.94		
	13	1.74		
4.5	1	3.29	1.42	28
	3	3.34		
	7	2.86		
	13	2.80		
6.0	1	4.85	1.15	19
	3	4.95		
	7	4.75		
	13	4.85		
7.5	1	6.31	1.22	16
	3	6.25		

## V. Oxalecetsav és hydrogenaktiválás.

*Szent-Györgyi* (2) szerint a biológiai oxydatio láncreakcióinak rendszerei közé még egy újabb illeszkedik: az aktiv tápanyaghydrogen és a cytochrom között az oxalecetsav-fumarsav reverzibilis redox rendszer van elhelyezve: másszóval a szövetlégzés egyik alapfeltétele a fumarsav oxydatioja és az oxalecetsav reductioja. Míg a fumarsav légzés-fokozó hatása már régebben ismeretes [*Thunberg, Grönwall* (13)] és mechanizmusát illetően is alaposan tanulmányozott [*Gözszy és Szent-Györgyi* (14), *Banga* (15), *Laki* (16)], addig az oxalecetsav reductiojára vonatkozólag csak élesztőben van biz'os adatunk [*Sin Ichiro Fujise* (17)]. Az oxalecetsav az állati szövetben oxydálódhatik, redukálódhatik, decarboxylálódhatik és átalakulhat aminosavvá. Hogy ezek közül a reakciók közül egyedül a reductio az, amely je-

lentős sebességgel folyik le, azzal a későbbiek során fogunk foglalkozni. Most legyen szabad előrevennem, hogy az oxalecetsaveltűnés első megközelítésben azonosítható az oxalecetsavnak almasavvá, ill. fumarsavvá való reduktiójával, hogy az erre vonatkozó vizsgálatokat, mint az oxalecetsav meghatározás gyakorlati példáit tárgyalhassam.

A már többször leírt módon elkészített izomsuspensióhoz különböző mennyiségű neutralizált oxalecetsavat téve vizsgáltam a megmaradt oxalecetsav mennyiségét különböző incubatio idők után ugyanazon izompreparatumra vonatkozólag, valamint összehasonlítólág különböző állatokból vett izmokból készült suspensiokban. A kapott eredmények közül néhányat a VII. Táblázat foglal össze.

VII. Táblázat.

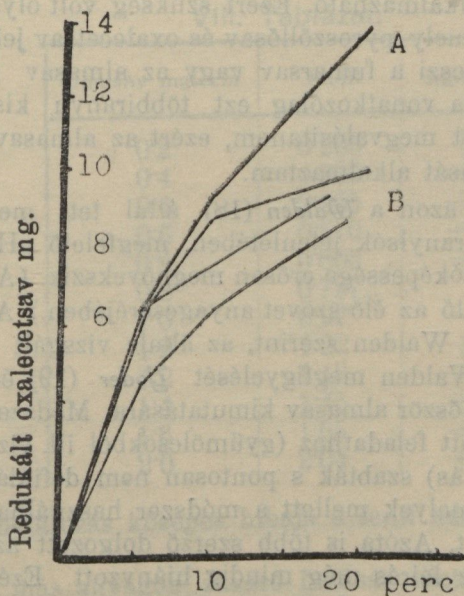
0.5 g izomhoz mg oxalecetsav	Kísérlet tartama	Talált mg oxalecetsav	Reducálódott mg
5.0	15'	0.0	5.0
10.0	"	0.8	9.2
20.0	"	5.1	14.9
35.0	"	19.0	16.0
5.0	5'	1.0	4.0
10.0	"	3.8	6.2
10.0	5'	4.1	5.9
10.0	10'	0.6	9.4
10.0	15'	0.1	9.9

Amint látható, koncentráció és idő szerint változó eredményeket kapunk. Egyes izompreparatumoknál a közölt értékeknel jóval alacsonyabb reduktiókat észlelünk, ami az izom oxalecetsavredukáló képességének mértékét jelzi. A 3. ábrán láthatunk néhány izomra vonatkozó görbét (B), amelyekben 10 mg oxalecetsav eltűnésének az időfüggvénye van feltüntetve.

Figyelembe véve az oxalecetsavnak a szövetlégzésben vitt szerepét (l. cit. 2), nyilvánvaló, hogy az oxalecetsav reduktójának sebessége, ha az oxalecetsav feleslegben van, a szövet aktivitásától és a hydrogendonálás intenzitásától függ. A hydrogenaktiválás mérését, a biochemia egyik legelterjedtebb módszerét *J. Thunberg* vezette be, felhasználva a methylenkének azt a képességét, hogy nagyon könnyen redukálódván,  $O_2$  kizárása mellett elszintelenedésével mutatja, hogy a szövetben

mint nem természetes  $H_2$ -acceptor képes szerepelni. Az elszintelenedés ideje fordított arányban áll a hydrogendonálás intenzitásával. Ezek a vizsgálatok két szempontból kifogásolhatók: először is ismeretes, hogy a methylenkék a szövetre nézve mérges, s így csak igen kis koncentrációban alkalmazható, másrészt az eredmények nem adnak olyan quantitativ adatot, ami más, a szövetlégzésre vonatkozó mérési eredménnyel, pl. az  $O_2$  felvétel nagyságával összehasonlítható volna.

Mindkét hátrányt kiküszöbölhetjük, ha nem methylenkékkel, hanem az izom természetes  $H_2$ -acceptorával végezzük a kísérletet. A vizsgálandó szövetsuspensiot felesleges (10–20 mg) oxalecetsavval ellátva  $37^\circ$ -on aerob rázatjuk 5 percig, s ezután meghatározzuk az oxalecetsav fogyasztást. Az eredményt átértékelhetjük  $O_2$ -felvételre, tudva azt, hogy egy molekula oxalecetsav reductioja megfelel egy atom oxygennek. A kísérletet nem kell levegő kizárása mellett végezni, mivel az oxalecetsav, addig amíg feleslegben van, a fumarsav reoxydatióját annyira meggátolja, hogy a reductio eredeti intenzitással folyhatik. Ilyen vizsgálatokra például szolgálhat a 3. ábrában közölt görbesorozat.



3. ábra. Oxalecetsav reductio időgörbéi.

„A” 40 mg. „B” 10–10mg kiindulási koncentráció.

## VI. Polarimetriás almasav meghatározás.

Az oxalecetsav reductió terméke vagy almasav, vagy fumarsav. Hogy a kettő közül melyik keletkezik mint a reductió primár terméke, az még nincsen eldöntve, de a quantitativ meghatározás szempontjából ez a körülmény nem jelent hátrányt. A szövetekben mindig jelenlevő fumarase hatására az almasav és a fumarsav enzimatiszus egyensúlyban van, 1 molekula fumarsavra esik 3 molekula almasav egyensúly esetén. Ha az izomszövethez akár almasavat, akár fumarsavat teszünk és 37°-on incubáljuk, akkor az első 10 percen belül már beáll az egyensúlyi állapot meglehetősen nagy mennyiségek esetén is. Természetes, hogy az izomban keletkező fumarsav ill. almasav jóformán keletkezésének pillanatában eléri az egyensúlyi helyzetet, aminek bizonyítása *Saki*-nak (22) fumarasementes succinodéhydraseval végzett kísérleteiben sikerült. A mondottak értelmében egyenlő értékkel bír a fumarsav és az almasav meghatározása. Mult évben végzett vizsgálataimban (23) leírtam egy fumarsavmeghatározást, amely azonban a jelen viszonyok között, amikor pyroszöllősav és oxalecetsav is van a reactionelegyben, nem alkalmazható. Ezért szükség volt olyan módszer alkalmazására, amely pyroszöllősav és oxalecetsav jelenléte esetén is lehetővé teszi a fumarsav vagy az almasav meghatározását. Fumarsavra vonatkozólag ezt többirányu kísérletezések után sem sikerült megvalósítanom, ezért az almasav polarimetriás meghatározását alkalmaztam.

A módszer azon a *Walden* (18) által tett megfigyelésen alapszik, hogy uranylsók jelenlétében, megfelelő pH mellett az l-almasav forgatóképessége erősen megnövekszik. (A d-módosulat nem fordul elő az élő szövet anyagcseréjében.) A specifikus forgató képesség *Walden* szerint, az általa vizsgált koncentrációban – 475°. *Walden* megfigyelését *Yoder* (19) és *Ohta* (20) használták fel először almasav kimutatására. Módszerüket azonban csak az adott feladathoz (gyümölcsökből ill. vizeletből történő meghatározás) szabták s pontosan nem definiálják azokat a feltételeket, amelyek mellett a módszer használható eredményeket szolgáltat. Azóta is több szerző dolgozott az eljárással, azonban a precíz leírás még mindig hiányzott. Ezért rendszeresen kidolgoztam a meghatározás feltételeit.

Mivel a specifikus forgatóképességre nézve az irodalomban közölt adatok ingadozók, először ezt a kérdést tanulmá-



nyoztam. Tiszta l-almasav oldatokat telítettem uranylacetattal, s a felesleges anyagról leszűrtem oldat forgatóképességét Na-lámpa fényében vizsgáltam. A koncentrációval nő a specifikus forgatóképesség és pedig 0·2 mg/ccm és 2·0 mg/ccm koncentrációk között  $-425^{\circ}$ -tól  $-470^{\circ}$ -ig változik, aminek oka különböző komplexek képződésében lehet. Mivel kísérleteinkben leginkább 1 mg/ccm körüli koncentrációkat határoztunk meg, az eredményeket egy közepes ( $-440^{\circ}$ ) érték alapján számítottuk.

A következőkben vizsgálat tárgyává tettem, hogy a pH-val hogyan változik a forgatás: uranylacetattal telítettem veronapufferrel különböző pH-ra beállított oldatokat. A forgatóképesség ugyanakkorának adódott pH 3 és pH 8 között, míg ez alatt és felett rohamosan csökkent. Ezért az oldatot, amely a fehérjétlenítés után savanyu,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ -al semlegesítettem annyira, hogy kongóval, de még lakmussal szemben is piros színnel reagált.

A fentiek szerint végeztem tiszta almasav oldatból meghatározásokat, hogy a módszer hibahatárai felől tájékozódjam. Ezek a kísérletek a következő, VIII. táblázatban vannak feltüntetve.

VIII. Táblázat.

almasav mg/ccm	talált	hiba %
0·2	0·205	+2
0·4	0·386	-3
0·4	0·405	+1
0·6	0·570	-5
0·8	0·805	+1
0·8	0·797	0
1·0	0·97	-3
1·2	1·22	+2
1·2	1·16	-3
1·4	1·45	+3
1·6	1·65	+3
2·0	2·04	+2

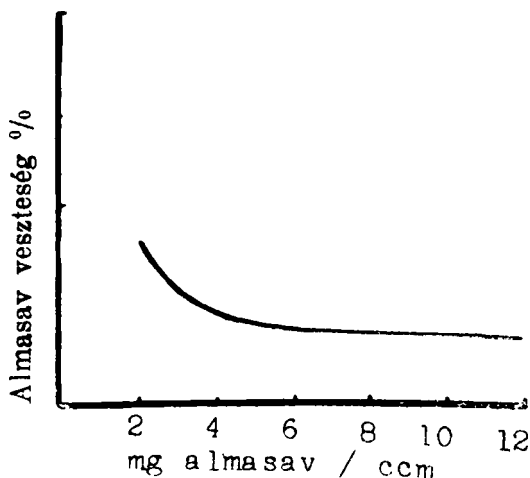
Egy meghatározás közepes hibája a fenti adatokból 2·6 %-nak adódik.

Ami más anyagok zavaró hatását illeti, a borkősav és a tejsav optikailag aktív módosulatai jönnek számításba. Míg első nem physiologiás termék, addig a d-tejsavval számolnunk kell.

1.85 mg d-tejsav/ccm	20 cm-es csőben forgat	— 0.036°
"	" uranylacetattal	" " — 0.160°
Specifikus forгатóképeesség :		— 43.2°

Mivel kísérleteink ritkán terjedtek 15 percen túli időkre, s ezen incubatio időn belül a tapasztalat szerint a tejsav koncentráció lényeges megváltozásáról nem lehet szó, a tejsavnak a meghatározásra gyakorolt hatását csak annyiban vettük figyelembe, amennyiben az izomsuspensio forгатóképeességét (almasav ill. más egyéb anyag hozzáadása nélkül is) meghatároztuk és a kísérletek eredményéből leszámítottuk.

Az almasavnak izomsuspensióból való visszanyerése szintén nem megy quantitative. Különböző mennyiségű almasavat adva a már ismertetett izomsuspensióhoz, 15 perces incubatio után végeztünk meghatározásokat. Ez idő alatt beállt az enzy-matikus egyensúly a fumarsav és az almasav között, amelynek figyelembevételével megállapíthattam, hogy az almasavnak mekkora mennyisége esik ki a meghatározásból. Ezeket az adatokat mint az almasav koncentrációjának függvényét ábrázolja a 4. ábra. A közölt görbe alapján az izomból végzett almasav meghatározás eredményei korrigálhatók.



4. ábra. Almasav meghatározás vesztesége izom jelenlétében.

Hogy az említett veszteség adsorptionnak tulajdonítandó és nem enzy-matikus uton tűnt el az almasav, azt bizonyítja az a körülmény, hogy 30, 45 és 60 perc múlva végzett meghatározásokban az almasav mennyiségét változatlanul ugyanakko-

rának találjuk, mint 15 perc után. Ezek a kísérletek nagyon szépen bizonyítják azt hogy az adsorptio okozta eltűnésen kívül, az oxydatios folyamatok tartama alatt az almasav mennyisége az izomban állandó marad, ami alapfeltétele annak, hogy az almasav ill. fumarsav az izomban katalytikus szerepét teljesítthesse. Egy ilyen kísérlet álljon itt példának (az értékek az adsorptio veszteségre nézve korrigálva vannak):

			talált alma + fumarsav
0.5g izom	+ 5 mg almasav	15 perc 37°-on	4.8 mg
"	"	30 "	4.8 mg
"	"	45 "	4.8 mg
"	"	60 "	4.8 mg

Már maga az a tény, hogy az almasav koncentrációja a szövetben ilyen hosszú időn keresztül állandó marad, annak dacára, hogy közben az oxygenfelvétel fokozódása, valamint más kísérletek (*Banga* (21)) világosan bizonyítják, hogy az almasav oxydálódik, arra mutat, hogy az oxalecetsav gyors redukciója megakadályozza azt, hogy decarboxylálódhasson. Ha az oxydatio alatt keletkezett oxalecetsav decarboxylálna jelentős mértékben, akkor ez a körülmény az almasav koncentráció csökkenésében kifejezésre jutna.

De megvilágítható a kérdés balance-kísérletekkel is. Ezekben a kísérletekben az izomszövethez tett oxalecetsav átalakulásait vizsgáltam oly módon, hogy 5—10—15 perces incubatio idő után a fehérjétlenített szüredéket megvizsgáltam oxalecetsavra, pyroszöllőssavra és almasavra. A számtalan kísérlet, melyet erre vonatkozólag végeztem, mind egyforma eredménnyel végződött, közülük a módszerek alkalmazásának megvilágítására álljon itt a következő kísérlet:

0.5 g izomszövetet tartalmazó 4 ccm suspensiohoz tettem 20 mg oxalecetsavat. 10 perc incubatio (37°-on) után találtam 12.9 mg oxalecetsavat, 2.7 mg pyroszöllőssavat és 4.7 mgr alma + fumarsavat. Eltűnt: 7.1 mg oxalecetsav. Az izomszövet jelenlétében *nem specifikus*, spontán decarboxylatio útján 10 perc alatt keletkezik 1.4 mg pyroszöllőssav, az oxalecetsavpreparatum a kiinduláskor már tartalmazott 1.0 mg pyroszöllőssavat, összesen ez 2.4 mg pyroszöllőssav, ami a talált 2.7 mg pyroszöllőssavnak nagyjából megfelel. Ez a pyroszöllőssavmennyiség megfelel 3.6 mg oxalecetsavnak, a keletkezett 4.7 mg almasav

megfelel 4·6 mg oxalecetsavnak, összesen 8·2 mg. Összesen tehát 8·2 mg oxalecetsavnak megfelelő almasavat és pyroszőlő-savat sikerül kimutatni. Ez több, mint az eltűnt 7·1 mg, a különbség az oxalecetsav meghatározás hibájának tudható be. Más esetekben a számítás kis oxalecetsav hiányt mutat, úgy-hogy gyakorlatilag azt a következtetést vonhatjuk le hogy az oxalecetsav eltűnésének megfelel egy *reductio nem specifikus, spontán decarboxylatio*. Ezekkel a kísérletekkel tehát bebizonyíthatjuk azt, hogy az oxalecetsav enzimatikusan katalysált reakciói közül egyedül a redukciónak van gyakorlati fontossága, vagyis az eredmény megfelel annak az elméletnek, amely az oxalecetsav-almasav rendszernek katalytikus szerepet tulajdonít, szemben a régi felfogással, hogy a mondott anyagok csak anyagsere közti termékek.

---

Dolgozatom befejezésével legmélyebb hálámat és köszönetemet legyen szabad kifejeznem *Szent-Györgyi* Professzor Urnak, aki kísérleteim egész folyamán irányításával, tanácsaival és buzdításával lehetővé tette, hogy munkámat eredményesen elvégezhessem.

Ezuton is kifejezem köszönetemet *Szegedy István* urnak, aki az analitikai módszerek finomításában tanácsaival sokszor segítségemre volt.

---

Jelen dolgozat készült a m. kir. Ferencz József Tudományegyetem Orvosi Vegytani Intézetében. (Igazgató: dr. Szent-Györgyi Albert egy. ny. r. tanár.)

## Irodalom.

- (1) *J. Thunberg*: Zentralbl. Physiologie *31*, 91, 1916., Skand, Arch. Phys. *35*, 163, 1917, *40*, 1, 1920., *41*, 77, 1921., *41*, 200, 1921., *44*, 200, 1923.
- (2) *A. Szent-Györgyi* Z. physiol. Chem. *236*, 1, 1935.
- (3) *H. Wieland* Liebigs Ann. *436*, 233, 1924
- (4) *R. L. Cook* Bioch. Journ. *24*, 1526, 1930.
- (5) *E. M. Case* Bioch Journ. *26*, 753, 1932.
- (6) *E. B. Wendel* J. biol. Chem. *94*, 717, 1932.
- (7) *Csonka* J. biol. Chem. *27*, 209, 1916.
- (8) *R. N. Sen, B. K. Sen* J. Indian Chem. Soc. *11*, 411, 1934.
- (9) *L. Mayer* Bioch. Z. *62*, 462, 1914.
- (10) *Hahn u. Haarmann* Z. f. Biologie *89*, 563, 1930. *87*, 465. 1928.
- (11) *H. Wieland* Liebigs Ann. *436*, 231, 1924.
- (12) *L. Ostern* Z. physiol. Chem. *218*, 183, 1933.
- (13) *Grönwall* Skand. Arch. Physiol. *45*, 303, 1924.
- (14) *B. Gözsy u. A. Szent-Györgyi* Z. physiol. Chem. *224*, 1, 1934.
- (15) *J. Bonga* Z. physiol. Chem. *236*, 20, 1935.
- (16) *K. Laki* Z. physiol. Chem. *236*, 31, 1935.
- (17) *Sin-Ichiro Fujise* Bioch. Z. *236*, 231, 1931.
- (18) *B. Walden* Berichte d. D. Chem. Ges. *30*, 2889, 1897.
- (19) *R. A. Yoder* Z. f. Nahrungs- u. Genussmittel *22*, 229, 1911.
- (20) *K. Ohta* Bioch. Z. *44*, 481, 1912.
- (21) *J. Bonga* Z. physiol. Chem. megjelenés alatt 1936.
- (22) *K. Laki* Z. physiol. Chem. megjelenés alatt 1936.
- (23) *F. B. Straub* Z. physiol. Chem. *236*, 42, 1935.



EQ4 - 94